

На правах рукописи

БЕДУЛЕВА Любовь Викторовна

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ
ЛИПИДНОГО СОСТАВА И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ
ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК**

Специальность: 03.00.04 - биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2004

Работа выполнена на кафедре биохимии и биотехнологии Тверского государственного университета, на кафедре иммунологии Удмуртского государственного университета.

Научный руководитель -

доктор биологических наук, профессор Грибанов Геннадий Александрович

Официальные оппоненты -

доктор биологических наук, профессор Ишмухаметова Диляра Галимовна

доктор медицинских наук, профессор Бутолин Евгений Германович

Ведущая организация – ГНЦ РФ - Институт иммунологии Минздрава России

Защита состоится 21 октября 2004 г.

в 14:30 на заседании диссертационного совета Д 212.081.08 в Казанском государственном университете по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская,18.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Казанского государственного университета по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская,18.

Автореферат разослан _____

Ученый секретарь диссертационного совета

кандидат биологических наук,

доцент

Аскарова А.Н.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Ключевое положение в иерархии систем управления иммунокомпетентных клеток (ИКК) занимают мембраны, на которых сосредоточены многие функциональные системы клеток. Определяющая роль в молекулярной организации и функционировании биологических мембран принадлежит липидам. Липидный состав детерминирует физико-химическое состояние мембран: их эластические и реологические свойства, проницаемость, стабильность, заряд (С.В. Конев, 1987; Р. Геннис, 1997). Современные исследования показывают, что липидные домены мембран создают функциональные «платформы» для множества сигнальных и транспортных путей клеток (М. Marmor, 2001; F. Van Laethem, 2002; L. Bini, 2003). Некоторые липиды и продукты их метаболизма несут информационную нагрузку, действуя как вторичные посредники в клетках при передаче сигнала (Р. Геннис, 1997; D.R. Jones, 1999), включаясь в межклеточные (Р. Grandmaison, 2004) и межсистемные взаимодействия (Е. Прахин, 2000; Р.Н. Степаненко, 2001). Известно, что регуляция клеточных функций биологически-активными соединениями, в частности, гормонами, простагландинами опосредована изменениями в липидном составе мембран клеток-мишеней (С.В. Конев, 1987; П.В. Сергеев, 1998; Э.А. Доценко 2001; F. Van Laethem, 2003). Вследствие кооперативной организации липидного компонента даже незначительные сдвиги в содержании отдельных липидов способны реализоваться в крупномасштабной глобальной перестройке мембран с гигантским коэффициентом усиления (С.В. Конев, 1987). Все это свидетельствует о том, что липиды занимают важное место среди факторов регуляции мембранных процессов клеток.

Специализированные клетки организма, к которым относят и ИКК, имеют ряд особенностей липидного состава. Как дифференцировка клеток, так и потеря клетками специфических функций сопровождается изменениями в организации и составе липидов мембран (Л.Д. Бергельсон, 1984; М. Ricardo, 1986; М. Chabot, 1990; S. Malapati, 2001). Это позволяет полагать, что липидный состав может быть ответственен за проявление специфических функциональных свойств клеток. Гетерогенность популяций клеток иммунной системы и их глу-

бокая морфо-функциональная специализация предполагают наличие особенностей в их липидном составе. Поэтому интерес представляет сравнительный анализ липидного состава популяций ИКК в связи с и их функциональными свойствами.

Функциональная активность (ФА) ИКК также находится под контролем их липидного состава. Цитотоксическая активность киллеров (В.А Извекова, 1991), хемотаксис нейтрофилов (В. Wolach, 1992), реакция бласттрансформации лимфоцитов на митогены (I. Seres, 1996) существенно зависят от липидного состава этих клеток. При этом исследователи отмечают ведущую роль холестерина (P. Kabouridis, 2000; Э. Доценко, 2001) и жирных кислот (T. Stulnig, 2001; S. Kew, 2003; P. Yaqoob, 2003) в регуляции функциональной активности ИКК в связи с их существенным влиянием на физико-химическое состояние мембран, а также ФТИ, с которым ассоциированы многие рецепторы ИКК (В.А. Извекова, 1991). На клиническом материале показано, что нарушения функциональной активности ИКК сопровождаются изменениями в их липидном составе. Обнаружены изменения в липидном составе ИКК при состояниях гиперчувствительности, иммунодефицитах (И.А. Горошинская, 1999; Е. Прахин, 2000; V. Pratt, 2002). Однако эти немногочисленные данные лишь открывают перспективу подобных исследований. Структурно-функциональная связь липидного состава с активностью ИКК остается не раскрытой и требует дальнейших исследований.

Для изучения взаимосвязи между липидным составом и функциональной активностью ИКК наряду с физиологическими используют различные экспериментальные модели, предполагающие модификацию липидного состава клеток. Липотропные и антиоксидантные свойства α -токоферола (X. Wang, 2000) позволяют рассматривать его как фактор модификации липидного состава ИКК. Кроме того, витамин Е действует на функциональную активность ИКК (M. De la Fuente, 2000). Поэтому влияние α -токоферола на липидный состав ИКК может быть удобной моделью в рамках исследований взаимосвязи между изменениями липидного компонента и функциональной активности ИКК.

Цель работы - исследовать взаимосвязь между липидным составом и функциональной активностью полиморфноядерных лейкоцитов (ПМЯЛ), мононуклеаров периферической крови человека и перитонеальных лейкоцитов крыс.

Задачи:

- изучить липидный состав мононуклеаров и ПМЯЛ периферической крови здоровых людей методом микротонкослойной хроматографии. Провести сравнительный анализ липидного состава мононуклеаров и ПМЯЛ в связи с их функциональными свойствами;
- исследовать зависимость между липидным составом ПМЯЛ периферической крови человека и их функциональной активностью в тестах на адгезию, фагоцитоз, бактерицидность и взаимосвязь между липидным составом мононуклеаров и их пролиферативной активностью в реакции бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ);
- проанализировать липидный состав перитонеальных лейкоцитов крыс и его связь с фагоцитарной, бактерицидной активностью, адгезией этих клеток;
- определить липидный состав мононуклеаров и ПМЯЛ и их функциональную активность у здоровых людей при приеме α -токоферола.

Научная новизна исследования. В работе впервые изучены особенности липидного состава ПМЯЛ и мононуклеаров периферической крови человека и дан их сравнительный анализ.

Выявлены новые факты взаимосвязи между липидным составом ИКК и их функциональной активностью. Обнаружена зависимость между содержанием лизофосфолипидов в ПМЯЛ крови людей и пороговым характером изменения фагоцитарной активности этих клеток. Показано, что уровень холестерина в ПМЯЛ крови человека является важным фактором, контролирующим проявление их бактерицидной активности, а от соотношения Хс/ФЛ зависит адгезия ПМЯЛ. Выявлено, что адгезия перитонеальных лейкоцитов крыс к пластику связана с уровнем фракции фосфатидилинозитолов и фосфатидилсеринов.

Выявлены специфические изменения в липидном составе ПМЯЛ и мононуклеаров периферической крови человека под влиянием α -токоферола. Обна-

ружен феномен оптимизации функциональной активности лимфоцитов крови человека витамином Е.

Практическая значимость исследования. Обнаруженная взаимосвязь между содержанием липидов и функциональной активностью ИКК указывает на то, что изменения в липидном составе могут быть важным патогенетическим звеном в нарушении функциональной активности ИКК. В связи с этим липидный состав ИКК можно рассматривать как мишень при выборе стратегии иммунотерапии. Терапия, направленная на модификацию липидного состава может способствовать уменьшению повреждающих эффектов при патологии. С другой стороны, изменения в липидном спектре могут быть следствием нарушений функциональной активности ИКК. Поэтому показатели липидного состава могут иметь важное клинко-диагностическое значение. В экспериментальной иммунологии модификация липидного состава может использоваться как подход для моделирования функциональных состояний ИКК.

Положения, выносимые на защиту.

1. Липидный состав ПМЯЛ и мононуклеаров периферической крови человека различен. В пуле холестерина мононуклеаров преобладает свободный холестерин, в ПМЯЛ – эфирносвязанный, что соответственно определяет различие индексов этерификации и Хс/ФЛ между этими клетками. Выявленные особенности в липидном составе могут быть ответственны за проявление специфических функциональных свойств клеток.
2. Лизофосфолипиды являются фактором пороговой регуляции фагоцитарной активности ПМЯЛ крови человека.
3. Полиморфноядерные лейкоциты крови человека при относительно низком уровне свободного холестерина в клетках могут находиться как в состоянии спонтанной бактерицидности, так и в активном состоянии. В то же время при относительно высокой концентрации холестерина обнаруживаются состояния клеток, отвечающие только низкому уровню их активности.
4. Витамин Е снижает уровень свободного холестерина и увеличивает долю его эфиров в мононуклеарах крови человека и модулирует стимулированную ФГА пролиферативную активность лимфоцитов периферической крови человека.

Апробация работы. Основные положения диссертации докладывались и обсуждались на: 6-ой Российской университетско-академической научно-практической конференции (Ижевск, 2003); 5-ой Тихоокеанской международной научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные проблемы экспериментальной, профилактической и клинической медицины» (Владивосток, 2004); 69-ой межвузовской конференции молодых ученых (Курск, 2004); 2-ой международной научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные исследования в системе образования», (Тамбов, 2004); 8-ой Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века», (Пущино, 2004), 59-ой межвузовской научно-практической конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения», (Екатеринбург, 2004); III съезде иммунологов России, (Екатеринбург, 2004).

По материалам диссертации опубликовано 10 научных работ.

Структура диссертационной работы. Работа изложена на 130 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, их обсуждения, выводов. Список литературы включает 188 источников, среди которых 59 отечественных и 129 иностранных. Работа иллюстрирована 22 таблицами, 25 рисунками. Приложение содержит 4 таблицы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования.

Объектом исследования явились иммунокомпетентные клетки: мононуклеары и полиморфноядерные лейкоциты периферической крови здоровых людей, а также перитонеальные лейкоциты крыс. В эксперименте использовали кровь доноров в возрасте от 20 до 30 лет (48 образцов). Кровь забирали в утренние часы. Для получения перитонеальных лейкоцитов крыс использовали белых беспородных крыс-самцов (9 животных) массой 200-250 г, содержавшихся на стандартном рационе.

Мононуклеары и ПМЯЛ получали из периферической крови человека, фракционированием в градиенте фиколл-верографина. При этом мононуклеары

на 80 % были представлены лимфоцитами и на 20 % моноцитами (Д.К. Новиков, 1996). Фракция ПМЯЛ содержала 98% нейтрофилов (Д.К. Новиков, 1996).

Экстракцию липидов проводили по методу Фолча. Липидный экстракт отмывали 0,73 % раствором NaCl (М.И. Прохорова, 1982). Фракционный состав общих липидов и фосфолипидов определяли методами микротонкослойной хроматографии (мТСХ) на силикагеле с последующим количественным анализом фракций. Общие липиды разделяли в системе гексан - диэтиловый эфир - метанол - ледяная уксусная кислота в соотношении 9:2:0,2:0,3 (Г.А.Грибанов, 1980). Количественное определение фракций проводили разложением с концентрированной серной кислотой. Фосфолипиды разделяли в системе хлороформ - метанол - ледяная уксусная кислота - вода в соотношении 5:3:0,8:0,4 (Г.А.Грибанов, 1980). Количество фосфолипидов определяли по неорганическому фосфору. Для этого липиды сжигали с хлорной кислотой, и образующийся неорганический фосфат определяли в цветной реакции с малахитовым зеленым (Г.А.Грибанов, 1980).

О функциональной активности ПМЯЛ и перитонеальных лейкоцитов крыс судили по фагоцитарной активности, бактерицидности в НСТ-тесте (Д.К. Новиков, 1996), адгезии к пластику (Р.М. Хаитов, 1995). Функциональную активность лимфоцитов определяли в РБТЛ. Клетки культивировали в среде RPMI-1640 с ФГА, 48 часов при 37°C. В качестве показателей пролиферативной активности лимфоцитов использовали спонтанную пролиферативную активность и пролиферативный ответ лимфоцитов на стимуляцию митогеном ФГА. Спонтанную пролиферативную активность определяли по потреблению глюкозы клетками в культуральной среде за время культивирования в лунках, не содержащих ФГА. Пролиферативную активность, стимулированную ФГА, определяли по индексу стимуляции ($ИС_{ФГА}$), который вычисляли как разницу между потреблением глюкозы с ФГА и спонтанным потреблением глюкозы за время культивирования.

При исследовании влияния α -токоферола на липидный состав и ФА мононуклеаров и ПМЯЛ периферической крови человека, добровольцы (11 человек)

принимали витамин Е в виде желатиновых капсул, содержащих 300 мг α -токоферола, один раз в день, в течение 10 дней. Все испытуемые были проинформированы о целях, методах, побочных эффектах, возможном риске, продолжительности и ожидаемых результатах исследования и дали письменное согласие на участие в исследовании. Были проанализированы липидный состав мононуклеаров и ПМЯЛ, а так же пролиферативная активность лимфоцитов в РБТЛ и функциональная активность ПМЯЛ в фагоцитарном тесте, НСТ-тесте, адгезии к пластику до приема витамина Е и на следующий день после последнего приема.

Сравнительный анализ липидного состава ПМЯЛ и мононуклеаров был проведен с помощью t-теста для независимых переменных. В эксперименте с витамином Е для определения значимости различий в липидном составе и ФА ИКК до и после приема витамина Е был использован t-тест для зависимых переменных. Для определения взаимосвязи между липидным составом и функциональной активностью использовали регрессионный анализ и корреляционный анализ по Пирсону (Г.Ф. Лакин, 1973). Результаты были обработаны с помощью программы Statistica 4.5 для Windows.

Результаты исследований и их обсуждение

1. Особенности липидного состава и функциональные свойства мононуклеаров и полиморфноядерных лейкоцитов крови людей.

Результаты исследований показали, что основные различия в липидном составе ПМЯЛ и мононуклеаров связаны с пулом холестерина (табл. 1).

Таблица 1

Содержание общих липидов (в мкг на 10^6 клеток) и фракционный состав общих липидов ИКК (в % от суммы фракций), ($M \pm m$)

	ОЛ	Фракции липидов						
		ФЛ	ДГ	Хс	СЖК	ТГ	ЭХ	ОХ
Мононуклеары, n = 15	68 ± 8	26,6 $\pm 2,6$	15,1 $\pm 3,0$	21,0 $\pm 2,0$	13,7 $\pm 1,6$	10,2 $\pm 1,2$	13,4 $\pm 2,0$	34,4 $\pm 2,5$
ПМЯЛ, n = 16	115 ± 38	25,8 $\pm 2,9$	12,1 $\pm 1,8$	9,3 $\pm 1,3$	12,4 $\pm 1,6$	11,3 $\pm 1,6$	29,1 $\pm 3,8$	38,4 $\pm 3,4$
p				<0,001			<0,001	

В мононуклеарах преобладает свободный холестерин, в ПМЯЛ – эфирно-связанный, что соответственно определяет различие индексов этерификации и Хс/ФЛ между мононуклеарами и ПМЯЛ (табл. 2). Индекс этерификации в ПМЯЛ примерно в 2 раза выше, чем в мононуклеарах. Так же ПМЯЛ за счет меньшего содержания свободного холестерина имеют более низкое молярное отношение Хс/ФЛ, чем мононуклеары.

Таблица 2

Индексные показатели липидного состава ИКК ($M \pm m$)

	Хс/ФЛ	ЭХ/ЭХ+Хс
Мононуклеары, n = 15	0,92±0,14	0,37±0,05
ПМЯЛ, n = 16	0,43±0,07	0,73±0,04
p	<0,01	<0,001

Обращает на себя внимание близкое к 1,0 значение индекса Хс/ФЛ в мононуклеарах, тогда как для большинства плазматических мембран оно варьирует от 0,5 до 0,8. Близкий к 1,0 индекс Хс/ФЛ соответствует высокой вязкости и низкой проницаемости мембраны (В.Н. Титов, 2000). Известно, что циркулирующие лимфоциты, выделенные из периферической крови, имеют более высокую вязкость мембран (W.J. Van Blitterswijk, 1984) и высокий индекс Хс/ФЛ (С.А. Голованов, 1976) по сравнению с лимфоцитами, полученными из лимфоузлов. Учитывая, что лимфоциты периферической крови являются низкоактивными клетками, в отличие от лимфоцитов, полученных из лимфоидных органов, где находятся центры активации и пролиферации лимфоцитов, можно предположить, что обнаруженный высокий индекс Хс/ФЛ в мононуклеарах отвечает неактивному состоянию циркулирующих лимфоцитов, которые составляют основную долю среди периферических мононуклеаров. В свою очередь обнаруженный в ПМЯЛ низкий индекс Хс/ФЛ, определяющий высокую текучесть мембран, может быть ответственен за такие функциональные свойства ПМЯЛ, как высокая подвижность в тканях и фагоцитоз.

Мембраны ПМЯЛ в очаге воспаления подвержены модифицирующему воздействию свободнорадикальных процессов. В связи с возможностью повреждения мембран и гибели клеток необходимы механизмы стабилизации мембран. Свободный холестерин способен ограничивать свободнорадикальные процессы в мембранах (А.М Samuni, 2000). В лимфоцитах и макрофагах при состояниях, сопровождающихся накоплением лизофосфолипидов, продуктов перекисного окисления липидов увеличивается содержание холестерина (Л.С Бикбулатова, 1990; Е.И Прахин., 2000). В нашем исследовании обнаружена отрицательная корреляционная зависимость между продукцией супероксид-аниона в НСТ-тесте и содержанием холестерина в ПМЯЛ (рис. 2). Указанные феномены и отмеченные выше свойства холестерина позволяют рассматривать его как фактор стабилизации мембран при повышении функциональной активности клеток, связанной с активацией свободнорадикального окисления. Эфиры холестерина в результате гидролиза холестеролэстеразой или других метаболических перестроек способны быстро превращаться в свободный холестерин. Поэтому высокий уровень эфиров холестерина в ПМЯЛ может являться источником свободного холестерина, принимающего участие в механизмах регуляции свободнорадикальных процессов в мембранах ПМЯЛ.

Таким образом, проведенные исследования позволили выявить ряд особенностей в липидном составе ПМЯЛ и мононуклеаров, которые, по-видимому, отражают различия в функциональных свойствах исследованных популяций ИКК.

2. Взаимосвязь липидного состава и функциональной активности иммунокомпетентных клеток.

2.1. Липидный состав и функциональная активность полиморфно-ядерных лейкоцитов периферической крови человека.

Исследование липидного состава и фагоцитарной активности ПМЯЛ крови людей обнаружило, что показатели фагоцитарной активности - фагоцитарный индекс (ФИ) и фагоцитарное число (ФЧ) положительно коррелируют с уровнем лизофосфолипидов ($r = 0,64$ ЛФЛ с ФИ и $r = 0,67$ ЛФЛ с ФЧ, $p < 0,05$, рис. 1а) и отрицательно коррелируют с уровнем фосфатидилхолинов (ФХ) в

клетках ($r = -0,63$ ФХ с ФИ и $r = -0,62$ ФХ с ФЧ, $p < 0,05$). При этом выявлена обратная зависимость между содержанием ЛФЛ и ФХ ($r = -0,57$, $p < 0,05$), указывающая на то, что активация фагоцитоза ПМЯЛ сопровождается накоплением ЛФЛ, основным источником образования которых являются ФХ.

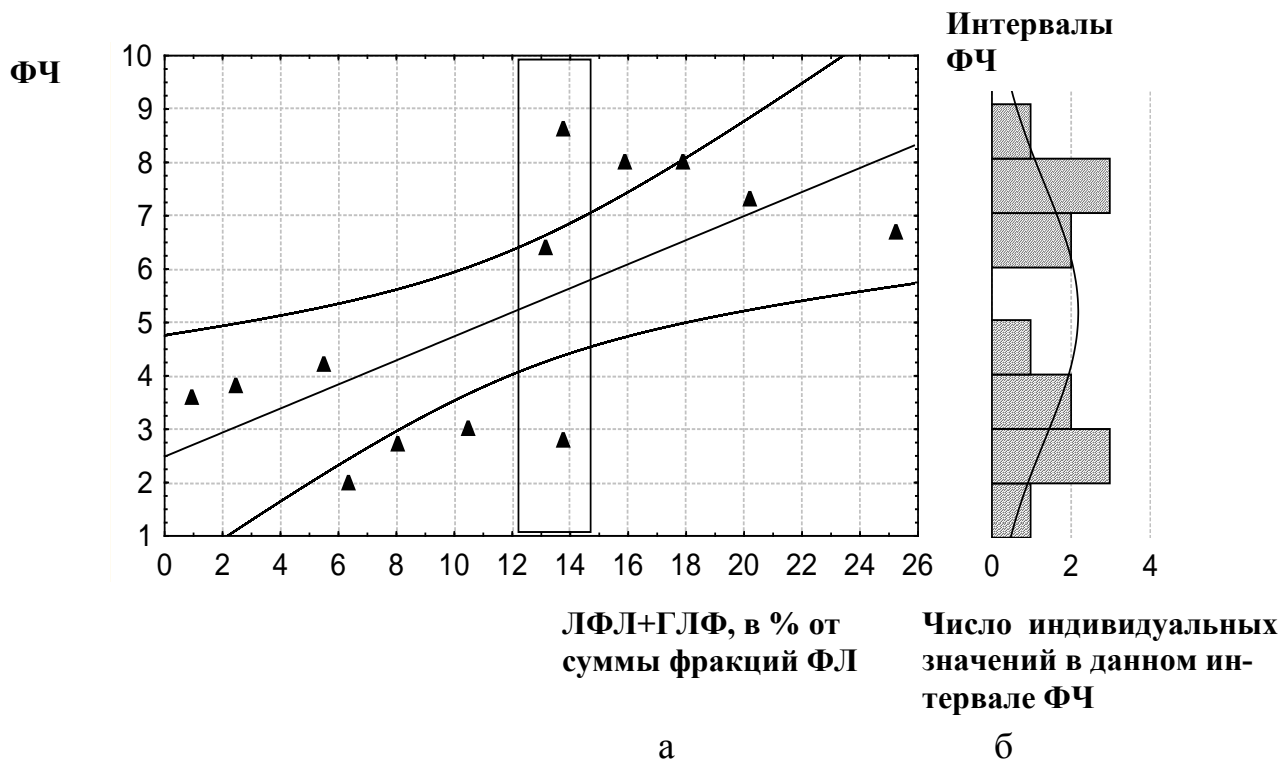


Рис. 1. а - зависимость ФЧ от уровня фракции ЛФЛ+ГЛФ в ПМЯЛ. Рамкой обозначена область перехода ПМЯЛ из состояния низкой в состояние высокой фагоцитарной активности.

—— Линия регрессии. - - - - - Границы доверительного интервала.

б - гистограмма распределения ФЧ.

—— Кривая нормального распределения для данной выборки.

При анализе характера варьирования функциональных показателей ПМЯЛ было обнаружено, что распределение показателей фагоцитарной активности ПМЯЛ обследованных доноров отличается от нормального, имеет двухвершинный характер (рис. 1б), тогда как распределение показателей бактерицидной активности в той же выборке соответствует нормальному. Сравнение эмпирических частот интервалов ФЧ и теоретически вычисленных показало, что они плохо согласуются между собой, что служит основанием считать распределение ФЧ не соответствующим нормальному закону.

Исходя из этого, можно выделить две группы значений фагоцитарной активности ПМЯЛ: группу с высоким уровнем фагоцитарной активности (ФИ =

$88,3 \pm 5,5$, $\Phi\text{Ч} = 7,5 \pm 0,3$) и группу с низким уровнем фагоцитарной активности ($\Phi\text{И} = 27 \pm 6,4$, $\Phi\text{Ч} = 3,1 \pm 0,3$). Данный факт может указывать на существование двух возможных дискретных состояний, отвечающих двум разным уровням фагоцитарной активности клеток: «активное» и «неактивное».

На рис. 1а показано, что изменение фагоцитарной активности от низкого уровня до высокого наблюдается в узком интервале концентраций ЛФЛ и имеет пороговый характер, что отвечает критериям кооперативных структурных перестроек мембран (С.В. Конев, 1987). Известно, что кооперативные перестройки выражены наиболее ярко при фазовых переходах липидов, когда скачком меняется ряд важнейших физико-химических свойств липидов – микровязкость, сжимаемость, механическая прочность, проницаемость, способность растворять различные вещества (С.В. Конев, 1987). В связи с этим ЛФЛ можно рассматривать как фактор пороговой регуляции фагоцитарной активности и предположить механизм переключения уровня фагоцитарной активности с участием лизофосфолипидов. ЛФЛ по своим свойствам являются поверхностно-активными хаотропными агентами, и могут участвовать в реорганизации липидной структуры бислоя (Г.А. Грибанов, 1991), определяя тем самым существование различных фазовых состояний мембран, влияющих на их свойства. Исследования на модельных мембранах показали, что к изменениям относительной доли некоторых липидов, чувствительна доменная организация липидов мембран (А.Н. Гольцов, 1995; Т.М. Stulnig, 2001; М. Zeyda, 2002). При этом возможны пространственные перегруппировки пула липидов, которые являются механизмом регуляции локальной вязкости мембран, подвижности интегральных белков, их активности, а так же функциональной активности клеток в целом. Возможно, что ЛФЛ в определенном интервале значений – зоне перехода (рис.1а), вызывают реаранжировку в композиции липидов мембран ПМЯЛ, которая может происходить с участием сложных метаболических перестроек. При этом разным композициям липидов мембран будут отвечать разные состояния фагоцитарной активности клеток, либо с высоким, либо низким уровнем.

Исследование липидного состава ПМЯЛ и интенсивности кислородзависимых механизмов бактерицидности в НСТ-тесте выявило взаимосвязь между показателями НСТ-теста и содержанием свободного холестерина в этих клетках (рис. 2).

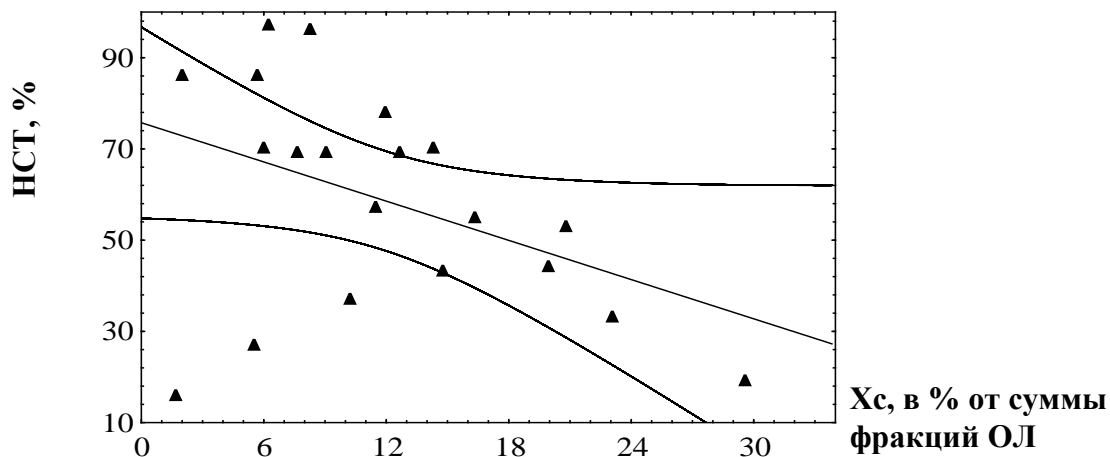


Рис. 2. Зависимость количества НСТ-положительных клеток от уровня холестерина в ПМЯЛ.
 ——— Линия регрессии. - - - - - Границы доверительного интервала.

Из представленных на рис. 2 данных видно, что при низком, относительно среднего, уровне свободного холестерина ПМЯЛ могут находиться как в состоянии спонтанной бактерицидности, так и в состоянии «кислородного взрыва». В то же время, при высокой, относительно средней, концентрации холестерина в клетках, обнаруживаются состояния ПМЯЛ, отвечающие только низкому уровню их активности. Обнаруженный факт указывает на то, что высокие концентрации свободного холестерина могут быть фактором, препятствующим переходу ПМЯЛ в состояние с высоким уровнем бактерицидности.

Таким образом, свободный холестерин в мембранах ПМЯЛ может являться важным фактором, определяющим проявление бактерицидной активности клеток.

Исследование взаимосвязи липидного состава ПМЯЛ человека и их адгезии к пластику показало, что уровень адгезии ПМЯЛ положительно коррелирует с индексом Хс/ФЛ в них ($r = 0,66$, $p < 0,05$, рис 3).

Учитывая, что тесному контакту мембран, их слипанию способствует дегидратация полярных групп липидных молекул (Р.Б. Геннис, 1997), можно предположить, что выявленное увеличение адгезии ПМЯЛ при росте индекса

Хс/ФЛ, связано со способностью холестерина снижать гидратацию мембран (А.М. Samuni, 2000).

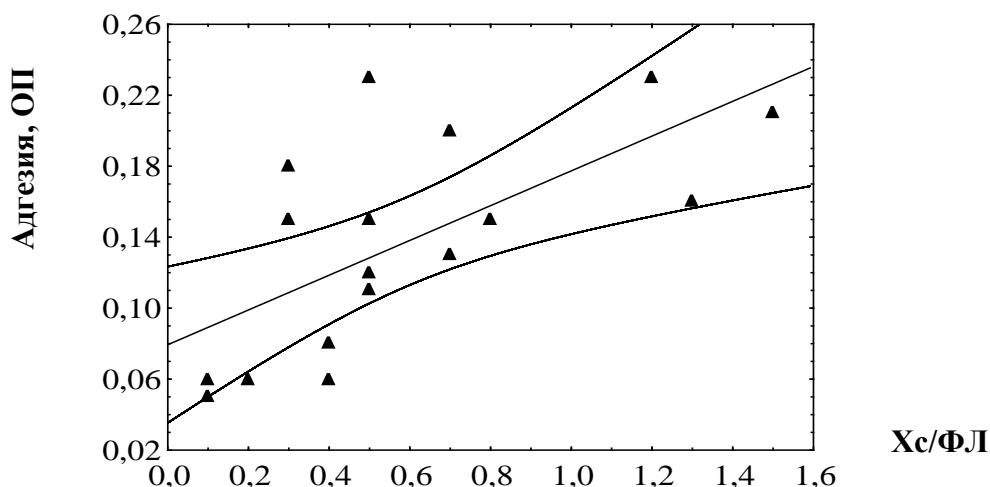


Рис. 3. Зависимость уровня адгезии ПМЯЛ к пластику от индекса Х/ФЛ.
 — Линия регрессии. - - - - - Границы доверительного интервала.

В связи с этим увеличение соотношения Хс/ФЛ в мембранах ПМЯЛ можно рассматривать как один из механизмов усиления адгезии ПМЯЛ.

2.2. Липидный состав и функциональная активность перитонеальных лейкоцитов крыс.

При исследовании взаимосвязи липидного состава и функциональной активности перитонеальных лейкоцитов крыс была обнаружена положительная корреляционная зависимость между адгезией клеток к пластику и уровнем фракции ФТИ и ФС ($r=0,79$, $p<0,05$, рис. 4).

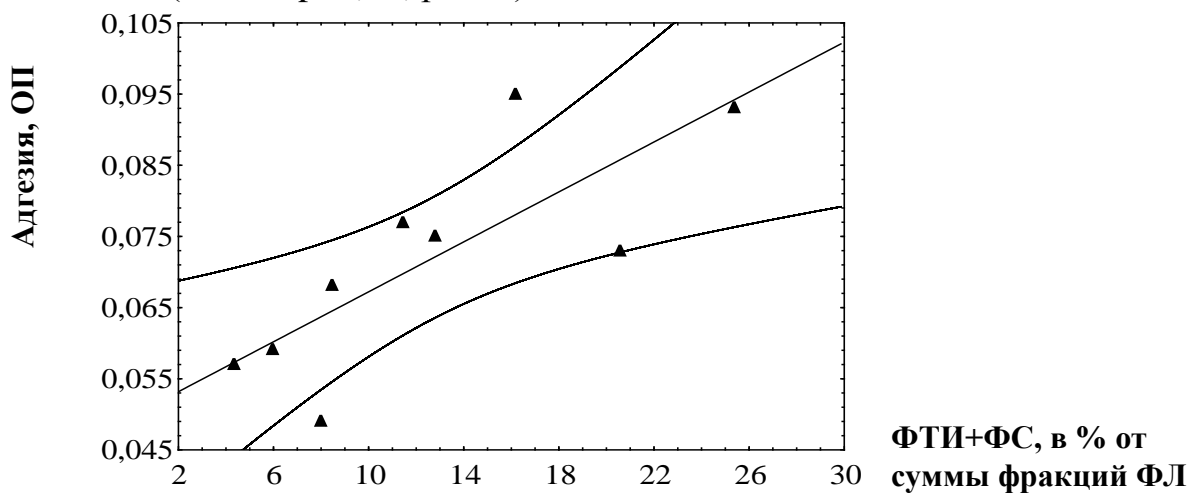


Рис. 4. Зависимость адгезии перитонеальных лейкоцитов крыс к пластику от уровня фракции ФТИ+ФС.

— Линия регрессии. - - - - - Границы доверительного интервала.

Согласно современным представлениям многие рецепторы ИКК ассоциированы с ФТИ (В.А. Извекова, 1991), для которых известно участие в пострецепторной передаче сигнала в клетку. Показано, что фактор, активирующий прилипание лейкоцитов, так же действует на ПМЯЛ через рецепторы, ассоциированные с ФТИ. Из этого следует, что содержание ФТИ может определять «отзывчивость» перитонеальных лейкоцитов крыс к фактору активации адгезии.

2.3. Липидный состав и функциональная активность мононуклеаров периферической крови человека.

Результаты исследования липидного состава мононуклеаров, которые были представлены в основном лимфоцитами, и их функциональной активности в РБТЛ позволили обнаружить отрицательную корреляцию между содержанием свободного холестерина и индексом стимуляции лимфоцитов ФГА в РБТЛ ($r = -0,81$, $p < 0,05$, рис. 5).

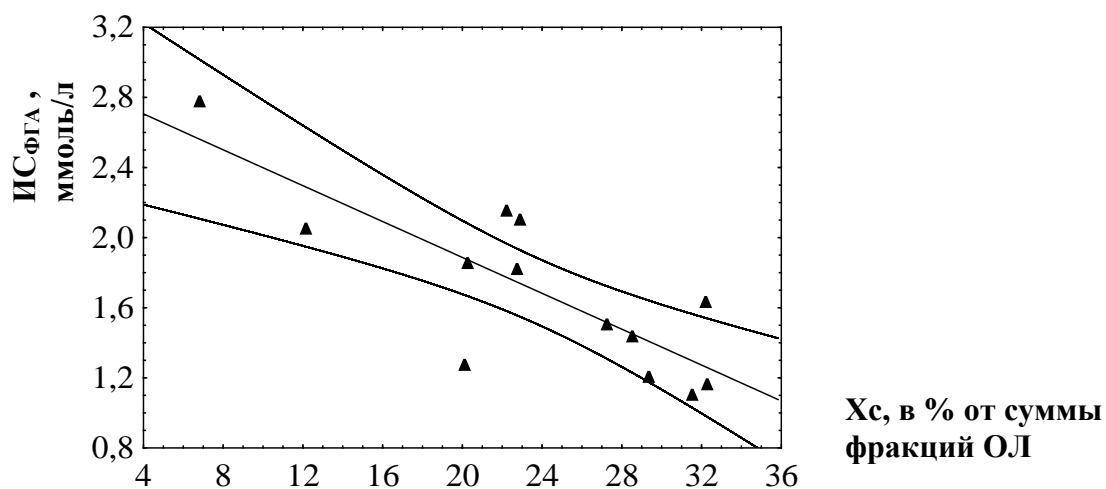


Рис. 5. Зависимость индекса стимуляции лимфоцитов ФГА в РБТЛ от уровня холестерина.

— Линия регрессии. ---- Границы доверительного интервала.

Феномен сочетания изменений содержания холестерина в лимфоцитах и уровня их пролиферативной активности показан в ряде исследований. Так у пациентов с гиперлипидемией наблюдается высокий уровень холестерина в лимфоцитах. При этом базальный уровень включения тимидина у таких пациентов повышен, но ответ на митоген конканавалин А снижен (I. Seres, 1996). За возрастное снижение «отзывчивости» лимфоцитов на ФГА также ответственны изменения в липидном составе клеток: увеличение уровня холестерина, соотношения Хс/ФЛ, ФЭА/ФХ (L.A Huber, 1991). Известно, что индексы Хс/ФЛ, ФЭА/ФХ

и содержание свободного холестерина являются критериями вязкости, проницаемости мембран (L.A Huber, 1991; Ю.С. Бутов, 2001). Изменение этих показателей модифицирует работу некоторых рецепторных и транспортных систем клеток, в том числе систем, участвующих в регуляции пролиферативной активности лимфоцитов, а также изменяет метаболическую активность клеток в целом. Так установлено, что уровень холестерина в лимфоцитах тесно связан с содержанием свободного кальция в них (I. Seres, 1996), который в свою очередь необходим для реализации активности протеинкиназы С и других ферментов, участвующих в процессах пролиферации лимфоцитов.

Таким образом, высокий уровень холестерина в лимфоцитах периферической крови человека подавляет их пролиферативную активность, стимулированную ФГА.

3. Влияние α -токоферола на липидный состав и функциональную активность мононуклеаров и полиморфноядерных лейкоцитов периферической крови человека.

В ходе исследований влияния приема витамина Е в дозе 300 мг/день в течение 10 дней на липидный состав и ФА мононуклеаров и ПМЯЛ крови здоровых людей взаимосвязи между количественными перестройками липидного компонента ПМЯЛ и мононуклеаров, вызванными витамином Е, и изменением функциональной активности клеток не обнаружено. Тем не менее, результаты влияния витамина Е на липидный состав и функциональную активность ИКК заслуживают внимания.

Выявлено, что прием 300 мг α -токоферола в течение 10 дней вызвал существенные количественные изменения в фосфолипидном составе ПМЯЛ, связанные с увеличением уровня ФС (с $13,5 \pm 2,6$ % до $22,1 \pm 3,3$ %, $p < 0,05$) и СМ (с $8,9 \pm 0,6$ % до $15,7 \pm 1,8$ % $p < 0,01$). На модельных мембранах было показано, что витамин Е в отношении фосфолипидов проявляет избирательную антиоксидантную активность, защищая от свободно-радикального окисления только ФС (А. Terrasa, 2000). В связи с этим можно предположить, что, обнаруженные в данном исследовании, изменения в составе фосфолипидов ПМЯЛ являются след-

ствием селективного влияния приема витамина Е на интенсивность перекисного окисления отдельных липидных фракций.

Исследование липидного состава мононуклеаров до и после приема 300 мг витамина Е показало, что под влиянием витамина Е изменился количественный состав общих липидов мононуклеаров за счет снижения содержания Хс (с $26,2 \pm 2,4$ % до $15,2 \pm 2,3$ %, $p < 0,05$), увеличения содержания ЭХ (с $14,0 \pm 2,0$ % до $31,7 \pm 4,5$ %, $p < 0,01$). При этом изменения относительного количества общего холестерина в мононуклеарах не происходило. Данный факт, а также наличие отрицательной корреляция ($r = -0,65$, $p < 0,05$) между содержанием свободного холестерина и эфирносвязанного в мононуклеарах после приема витамина Е, свидетельствуют об усилении этерификации свободного холестерина в этих клетках в условиях приема витамина Е. Можно полагать, что изменения в липидном составе функционально различных ИКК под влиянием витамина Е носят достаточно специфический характер.

Результаты исследований функциональной активности ПМЯЛ до и после приема витамина Е показали, что изменений фагоцитарной, бактерицидной активности, адгезии в условиях проведенного эксперимента не обнаружено. Отсутствие изменений функциональной активности ПМЯЛ на фоне модификации их фосфолипидного спектра может указывать на независимость исследованных функциональных свойств ПМЯЛ от количества СМ и ФС в этих клетках.

При изучении влияния приема витамина Е на пролиферативную активность лимфоцитов, стимулированную ФГА, выявлено, что характер ответа лимфоцитов на прием витамина Е определяется исходным уровнем их пролиферативной активности. Витамин Е увеличивал активность клеток с исходно низким уровнем пролиферативной активности в ответ на ФГА с $1,8 \pm 0,18$ ммоль/л до $4,34 \pm 0,69$ ммоль/л и снижал активность лимфоцитов, имеющих изначально высокий уровень, с $3,03 \pm 0,23$ ммоль/л до $1,9 \pm 0,61$ ммоль/л. Данный феномен был обнаружен ранее французским исследователем De la Fuente, (2000).

Таким образом, выявленный факт позволяет предполагать модулирующий характер воздействия витамина Е на пролиферативную активность лимфоцитов.

ВЫВОДЫ

1. Сравнительный анализ липидного состава мононуклеаров и полиморфноядерных лейкоцитов периферической крови здоровых людей выявил, что в пуле холестерина мононуклеаров преобладает свободный холестерин, тогда как в полиморфноядерных лейкоцитах - эфирносвязанный. За счет меньшего содержания свободного холестерина полиморфноядерные лейкоциты имеют более низкое молярное отношение $Xc/ФЛ$, чем мононуклеары. Особенности липидного состава полиморфноядерных лейкоцитов и мононуклеаров могут отражать различия в их функциональных свойствах.
2. Распределение показателей фагоцитарной активности в исследуемой выборке имеет двухвершинный характер, что указывает на существование двух дискретных функциональных состояний, отвечающих двум разным уровням фагоцитарной активности полиморфноядерных лейкоцитов людей. Обнаруженная взаимосвязь между уровнем лизофосфолипидов и фагоцитарной активностью полиморфноядерных лейкоцитов позволяет рассматривать лизофосфолипиды как фактор пороговой регуляции фагоцитарной активности клеток.
3. Полиморфноядерные лейкоциты периферической крови человека при относительно низком уровне свободного холестерина в клетках могут находиться как в состоянии спонтанной бактерицидности, так и в активном состоянии. В то же время при относительно высокой концентрации холестерина в полиморфноядерных лейкоцитах обнаруживаются состояния клеток, отвечающие только низкому уровню их активности.
4. Увеличение соотношения $Xc/ФЛ$ в мембранах полиморфноядерных лейкоцитов периферической крови можно рассматривать как один из механизмов усиления их адгезии. Адгезия перитонеальных лейкоцитов крыс к пластику положительно коррелирует с уровнем фосфатидилинозитолов и фосфатидилсеринов.
5. При относительно высоком уровне свободного холестерина в лимфоцитах периферической крови человека снижается их пролиферативная активность в реакции бласттрансформации, стимулированной фитогемагглютинином.

6. α -токоферол при приеме в дозе 300 мг/день в течение 10 дней вызвал увеличение уровней фосфатидилсеринов и сфингомиелинов в полиморфноядерных лейкоцитах периферической крови человека, что может быть следствием избирательной антиоксидантной активности витамина Е. Изменений функциональной активности полиморфноядерных лейкоцитов в тестах фагоцитарной, бактерицидной активности и адгезии не обнаружено.
7. В мононуклеарах периферической крови человека отмечено снижение уровня свободного холестерина и увеличение его эфиров при приеме α -токоферола в дозе 300 мг/день в течение 10 дней. Выявлен модулирующий эффект α -токоферола на пролиферативную активность лимфоцитов в реакции бласттрансформации, вызванной фитогемагглютинином.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Грибанов Г.А., Бедулева Л.В., Меньшиков И.В., Ребров Л.Б., Мальцева В.Н. Об особенностях липидного состава некоторых иммунокомпетентных клеток крови человека//Биомедицинские технологии. - 2002.- С.81-85.
2. Грибанов Г.А., Бедулева Л.В., Меньшиков И.В., Ребров Л.Б., Мальцева В.Н. Исследование взаимосвязи липидного состава полиморфноядерных лейкоцитов и их функциональной активности//Биомедицинские технологии. – 2003. – Вып. 20. - С.131-141.
3. Бедулева Л.В. Исследование взаимосвязи липидного состава и функциональной активности мононуклеаров периферической крови человека//6-ая Рос. университетско-академическая конференция. Матер. докл. - Ижевск, 2003. – С.342.
4. Бедулева Л.В., Грибанов Г.А. Исследование липидного состава и адгезии полиморфноядерных лейкоцитов крови человека и перитонеальных лейкоцитов крыс//8-ая Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых "Биология – наука XXI века"- Пущино, 2004. – С.46.
5. Бедулева Л.В., Булатова Н.И. Влияние приема витамина Е на липидный состав и функциональную активность мононуклеаров периферической крови человека//Матер. 69-й межвуз. конф. молодых ученых – Курск, 2004. – Ч.1. - С.29-30.
6. Грибанов Г.А., Меньшиков И.В., Бедулева Л.В. Изменение функциональной активности и липидного состава перитонеальных лейкоцитов крыс при одно-

кратном введении гидрокортизона//Материалы 2-ой международной научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные исследования в системе образования» – Тамбов, 2004. – Ч.1. - С.34-36.

7. Бедулева Л.В., Попович К.А. Влияние приема витамина Е на липидный состав полиморфноядерных лейкоцитов и мононуклеаров периферической крови человека//Акт. воп. совр. мед. науки и здравоохранения. Матер. 59-ой межвуз. конф. молодых ученых с междунар. участием. – Екатеринбург, 2004. – С. 163.

8. Меньшиков И.В., Бедулева Л.В., Грибанов Г.А. Влияние глюкокортикоидов на липидный состав и функциональную активность перитонеальных лейкоцитов крыс//Russian J. of Immunology. Тез. докл. – 2004. – Vol. 9. - С.286.

9. Грибанов Г.А., Меньшиков И.В., Бедулева Л.В. Липидный состав и функциональная активность полиморфноядерных лейкоцитов периферической крови человека//Иммунология. - 2004. - №5.-С.268-271.

Список сокращений, используемых в работе

ГЛФ – глицерофосфаты	СМ – сфингомиелины
ДГ – диглицериды	ТГ – триглицериды
ИКК – иммунокомпетентные клетки	ФА – функциональная активность
ИС – индекс стимуляции	ФГА - фитогемагглютинин
ЛФЛ - лизофосфолипиды	ФИ – фагоцитарный индекс
НСТ - нитросиний тетразолий	ФЛ - фосфолипиды
ОЛ – общие липиды	ФС - фосфатидилсерины
ОП – оптическая плотность	ФТИ – фосфатидилинозитолы
ОХ –общий холестерин	ФХ – фосфатидилхолины
ПМЯЛ – полиморфноядерные лейкоциты	ФЧ – фагоцитарное число
РБТЛ – реакция бласттрансформации лимфоцитов	Хс – свободный холестерин
СЖК – свободные жирные кислоты	ЭХ - эфиры холестерина
	n – количество исследований